

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13914:2023

ISO 16712:2005

Xuất bản lần 1

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC –
XÁC ĐỊNH ĐỘ ĐỘC CẤP TÍNH CỦA TRẦM TÍCH BIỂN
HOẶC CỬA SÔNG ĐỐI VỚI GIÁP XÁC AMPHIPODA**

*Water quality – Determination of acute toxicity of marine or estuarine
sediment to amphipods*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13914:2023 hoàn toàn tương đương với ISO 16712:2005.

TCVN 13914:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này đưa ra quy trình thực hiện các phép thử độ độc cấp tính của trầm tích, sử dụng một hoặc nhiều loài giáp xác amphipoda chủ yếu được tìm thấy dưới bề mặt trầm tích ở vùng ven biển và vùng cửa sông. Điểm kết thúc sinh học đối với thử nghiệm là phần trăm tỷ lệ chết vào ngày thứ 10.

Chất lượng nước –

Xác định độ độc cấp tính của trầm tích biển hoặc cửa sông đối với giáp xác amphipoda

Water quality –

Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định độ độc cấp tính đối với giáp xác amphipoda (giáp xác chân đều) được tiếp xúc trong khoảng thời gian 10 ngày đối với:

- Các mẫu trầm tích biển hoặc các mẫu trầm tích cửa sông bị ô nhiễm,
- Bùn hóa chất, bùn công nghiệp hoặc bùn đô thị, hoặc các chất thải rắn khác có thể kết hợp với trầm tích biển hoặc trầm tích cửa sông, hoặc
- Hóa chất hoặc chế phẩm được bổ sung vào trầm tích sạch.

2 Nguyên tắc

Các loài giáp xác amphipoda ở biển hoặc cửa sông thường sống dưới bề mặt trầm tích được tiếp xúc 10 ngày với trầm tích bị ô nhiễm hoặc trầm tích có bổ sung hóa chất thử nghiệm. Điểm kết thúc của phép thử là phần trăm tỷ lệ chết của giáp xác. Phép thử được thực hiện trong các bình 1 L chứa 175 mL trầm tích pha rắn và lớp nước phía trên. Độ mặn và nhiệt độ phụ thuộc vào loài giáp xác amphipoda được sử dụng trong thử nghiệm.

3 Môi trường thử nghiệm

3.1 Cơ sở vật chất (phòng, buồng thử nghiệm)

Khu vực thử nghiệm phải được thông gió tốt, tránh xáo trộn vật lý và không có bụi và khói.

3.2 Chiếu sáng

Tất cả các bình thử nghiệm phải được chiếu sáng trực tiếp, chiếu ánh sáng bình thường trong phòng thử nghiệm (tức là 500 lx đến 1 000 lx) lên mặt nước. Việc chiếu sáng phải đồng đều và phải liên tục

trong suốt thời gian thử nghiệm để hạn chế sự di chuyển về đêm của giáp xác amphipoda vào cột nước^[39].

4 Thuốc thử và vật liệu thử

4.1 Sinh vật thử nghiệm

4.1.1 Yêu cầu chung

Cần sử dụng một trong các loài giáp xác amphipoda sống ở biển hoặc cửa sông được liệt kê trong Phụ lục B để làm sinh vật thử nghiệm cho phương pháp nêu trong tiêu chuẩn này. Cần sử dụng khóa phân loại^[18] để xác định loài và được xác nhận bởi nhà phân loại học có hiểu biết sâu về giáp xác amphipoda ở biển hoặc cửa sông.

4.1.2 Độ tuổi và kích thước

Phải sử dụng các giáp xác amphipoda có độ tuổi và kích thước đồng đều để thử nghiệm và không được lớn hơn kích thước tối đa cho phép của loài được liệt kê trong Phụ lục B. Không sử dụng những con cái trưởng thành mang phôi hoặc các cá thể dài hơn chiều dài tối đa (kể cả râu) vì độ tuổi của những cá thể này có thể không phù hợp, tuổi phù hợp cho phép thử được xác định trong Phụ lục B.

4.1.3 Nguồn

Tất cả các loài giáp xác amphipoda được sử dụng trong thử nghiệm phải được lấy từ cùng một quần thể và cùng nguồn. Các sinh vật thử nghiệm có thể mới được lấy từ khu vực các chất có mức ô nhiễm bằng hoặc thấp hơn mức nền, hoặc các sinh vật có thể được nuôi trong phòng thử nghiệm ^{[11], [12], [48]}.

4.1.4 Thu thập, xử lý và vận chuyển

Tùy thuộc vào loài và/hoặc điều kiện địa điểm thu gom, lấy mẫu các giáp xác amphipoda sử dụng dụng cụ phần ngoạm sinh vật đáy¹⁾, dụng cụ nạo vét sinh học nhỏ hoặc xẻng tại các vùng triều. Nếu sử dụng dụng cụ nạo vét, thì vét một đoạn ngắn (< 10 m) để giảm thiểu hư hại cho cá thể thử nghiệm^[39]. Thu lấy nhiều hơn ít nhất một phần ba cá thể thử nghiệm yêu cầu cho phép thử. Chọn vị trí thu thập mà trước đó cho thấy có nhiều sinh vật có kích thước và độ tuổi chính xác hoặc bằng cách sàng để thu thập trước trầm tích tại địa điểm lấy^[31]. Các sinh vật được sử dụng làm loài thử nghiệm phải được xác nhận về mặt phân loại (ví dụ: Tài liệu tham khảo [4], [5], [32]).

Đo và ghi lại độ mặn, nhiệt độ và hàm lượng oxy hòa tan của nước gần với trầm tích tại điểm thu gom. Sàng các mẫu trầm tích tại thời điểm thu gom qua sàng có mắt lưới từ 0,5 mm đến 1,0 mm. Việc lựa chọn cỡ sàng phụ thuộc vào kích thước của loài sinh vật được thu thập và việc này rất quan trọng để xác định số lượng giáp xác amphipoda được thu hồi. Sàng phải được làm bằng vật liệu không độc.

¹⁾ Smith-McIntyre và Van Veen là các mẫu sản phẩm phù hợp có sẵn ngoài thị trường. Thông tin này được đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng và không được chứng thực bởi tiêu chuẩn này.

Sử dụng nước tại điểm thu thập để sàng trầm tích tại hiện trường và để phủ trầm tích trong thùng chứa trong quá trình thu thập và vận chuyển mẫu. Loại bỏ mảnh vụn và cá thể ăn thịt đã thu được bằng sàng. Vận chuyển giáp xác amphipoda thu được ở nhiệt độ mát, với các vật hữu sinh và vô sinh như rong biển đựng trong thùng vận chuyển, hoặc với lớp nước ở trên và giáp xác amphipoda trở lại lớp trầm tích trong thùng vận chuyển. Sục không khí vào lớp nước trong quá trình vận chuyển. Cần có một phần trầm tích đã sàng trong phòng thử nghiệm sử dụng để giữ giáp xác amphipoda và làm trầm tích đối chứng. Dự trữ một phần trầm tích để phân tích vật lý (ví dụ: cỡ hạt) và phân tích hóa học. Cách khác, thu thập và vận chuyển giáp xác amphipoda trong trầm tích với lượng lớn mà không cần sàng tại hiện trường. Tuy nhiên, các sinh vật ăn thịt phải được nhặt để loại ra khỏi thùng trước khi vận chuyển.

Trong quá trình vận chuyển cần cố gắng duy trì nhiệt độ và độ mặn của nước thu gom tại điểm lấy mẫu. Nhiệt độ trong thùng chứa vận chuyển không được vượt quá phạm vi tối ưu đối với các loài giáp xác amphipoda cụ thể, như trong Phụ lục B. Lớp nước biển phía trên phải được sục khí trong quá trình vận chuyển.

4.1.5 Giữ và làm thích nghi

Nếu cần, các mẫu thu thập tại hiện trường có thể được sàng lại khi đưa trở lại phòng thử nghiệm (lỗ sàng từ 0,5 mm đến 1,0 mm tùy thuộc vào kích thước của giáp xác amphipoda được sử dụng trong thử nghiệm), nếu muốn đánh giá tỷ lệ sống của giáp xác và xác định loài, chọn và đếm số lượng giáp xác amphipoda có kích thước phù hợp để thử nghiệm. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng việc sàng lại các giáp xác amphipoda thu được tại hiện trường trong phòng thử nghiệm sẽ làm gây áp lực thêm cho các sinh vật. Sử dụng nước biển từ địa điểm thu gom, tại hiện trường hoặc nước biển đã hoàn nguyên, làm lớp nước phía trên thùng chứa vận chuyển, duy trì độ mặn ban đầu (trong dải ± 2 g/kg) và nhiệt độ (trong khoảng ± 2 °C) của nước biển tại địa điểm thu gom trong suốt quá trình vận chuyển.

Trong phòng thử nghiệm, lắc nhẹ sàng được ngâm trong nước biển để tách các sinh vật và di chuyển chúng bằng pipet miệng rộng, thìa hoặc lưới mịn. Đảm bảo rằng các sinh vật được sàng luôn chìm trong nước biển. Để giảm thiểu gây áp lực, cần xử lý cẩn thận và nhanh các sinh vật. Phải loại bỏ cá thể giáp xác amphipoda bị chết, bị thương hoặc tiếp xúc với bề mặt khô. Chỉ chuyển những con giáp xác amphipoda đang hoạt động và khỏe mạnh mới vào thùng giữ/thùng chứa để thích nghi. Tùy thuộc vào loài, các cá thể không chui xuống hoặc trôi lên khỏi trầm tích bất cứ lúc nào trong thời gian giữ/thích nghi và dường như đã chết hoặc không hoạt động khi bị chạm nhẹ phải bị loại bỏ. Vào ngày thử nghiệm, cần chọn những cá thể đang hoạt động và khỏe mạnh, đồng thời có hình dáng và tập tính đặc trưng cho loài đó. Loại bỏ những cá thể có dấu hiệu không bình thường hoặc không điển hình.

Đếm các giáp xác amphipoda đã chọn để sử dụng trong thử nghiệm khi chúng được chuyển vào các dụng cụ chứa (ví dụ: khay nhựa hoặc cốc thủy tinh). Cho ít nhất từ 2 cm đến 4 cm trầm tích đối chứng đã sàng lọc lại trước đó (không có giáp xác amphipoda nhỏ và các sinh vật khác) và ít nhất từ 2 cm đến 5 cm lớp nước biển phía trên vào các dụng cụ chứa này. Mật độ của các sinh vật cỡ lớn trong trầm tích không được vượt quá mật độ quan sát được tại hiện trường hoặc một cá thể giáp xác amphipoda trên một cm² để tránh mật độ quá dày đặc.

Đặt các thùng chứa có các sinh vật ở một trong những nơi sau:

- a) Bể hoặc máng có nước biển chảy;
- b) Bể lớn (ví dụ: từ 60 L đến 100 L) chứa nước biển hoàn nguyên hoặc nước biển sạch được giữ trong điều kiện tĩnh;
- c) Bể nhỏ hơn (ví dụ: từ 20 L đến 40 L) chứa nước biển được giữ trong điều kiện bán tĩnh (ví dụ: thay mới 50 % lượng nước biển hàng ngày), trừ khi sử dụng hệ thống nước tái chế bằng xử lý thích hợp, trong trường hợp đó hàng ngày không cần thay nước biển mới; hoặc
- d) Phòng riêng biệt với điều kiện nhiệt độ và ánh sáng thích hợp.

Thời gian chiếu sáng 16 h và để tối 8 h được khuyến nghị trong quá trình giữ/thích nghi giáp xác amphipoda. Nước biển trong dụng cụ chứa phải được sục khí.

Các giáp xác amphipoda thu được tại hiện trường hoặc được nuôi phải được thích nghi với các điều kiện nhiệt độ và độ mặn thử nghiệm trong thời gian tối thiểu 3 ngày. Khi đến phòng thử nghiệm, để giáp xác amphipoda thích nghi từ điều kiện độ mặn tại hiện trường sang điều kiện độ mặn thử nghiệm bằng cách thay đổi độ mặn trong dụng cụ chứa với tốc độ 5 g/(kg x ngày) (hoặc chậm hơn tùy thuộc vào loài được sử dụng). Sự thích nghi của giáp xác amphipoda với các điều kiện nhiệt độ thử nghiệm, bên trong dụng cụ chứa/dụng cụ chứa thích nghi, tốc độ tăng nhiệt độ không được quá 3 °C/ngày. Sau khi đạt được điều kiện độ mặn thử nghiệm, giữ sinh vật ở độ mặn đó trong ít nhất 24 h trước khi thử nghiệm.

Nhiệt độ, độ mặn, độ pH và hàm lượng oxy hòa tan phải được theo dõi và ghi lại hàng ngày trong giai đoạn thích nghi ban đầu, khi các giáp xác amphipoda đang thích nghi với các điều kiện thử nghiệm. Sau đó, nhiệt độ, độ mặn, pH và hàm lượng oxy hòa tan phải được đo trong thời gian thích nghi còn lại, và phải được đo và ghi lại vào cuối thời kỳ thích nghi. Định kỳ hoặc liên tục thay lớp nước phía trên (tức là hàng ngày hoặc hai ngày một lần) bằng nước biển mới, đã bão hòa không khí được điều chỉnh theo nhiệt độ và độ mặn cần thiết. Trong khi khoảng thời gian tối thiểu của giai đoạn giữ/thích nghi đối với giáp xác amphipoda là 3 ngày, thời gian giữ đối với các sinh vật thử nghiệm thu được tại hiện trường không được vượt quá 14 ngày trước khi sử dụng để thử nghiệm. Thời gian giữ tối đa không áp dụng cho các sinh vật thử nghiệm được nuôi cấy trong phòng thử nghiệm. Không được cho giáp xác amphipoda ăn trong thời gian chúng thích nghi hoặc trong điều kiện thử nghiệm.

4.2 Lớp nước phía trên

4.2.1 Yêu cầu chung

Cá thể giáp xác amphipoda được giữ và thích nghi bằng cách sử dụng nguồn cấp nước biển tự nhiên không bị ô nhiễm hoặc nước biển hoàn nguyên. Nguồn cấp nước biển được sử dụng phải được theo dõi và đánh giá thường xuyên theo yêu cầu để ghi lại chất lượng. Đo độ mặn, độ pH, hàm lượng oxy hòa tan, nitơ amoniac, nitrit, thuốc trừ sâu có liên quan và kim loại của nước biển được sử dụng.

Nước khử ion hoặc nước cất được ưu tiên sử dụng để chuẩn bị nước biển hoàn nguyên. Cũng có thể sử dụng nước uống đã khử clo, nước mặt tự nhiên hoặc nước ngầm.

Nước biển được sử dụng để giữ, thích nghi và thử nghiệm giáp xác amphipoda không được có chất lơ lửng. Nên lọc nước biển ($< 5 \mu\text{m}$) trước khi sử dụng để đảm bảo loại bỏ các hạt lơ lửng và sinh vật. Nếu được bảo quản, giữ nước biển tự nhiên trong khoảng nhiệt độ thích hợp cho loài thử nghiệm (xem Phụ lục B) và sử dụng trong vài ngày. Đối với các phòng thử nghiệm có hệ thống xử lý nước như bộ lọc dùng cát, nước biển có thể được giữ trong thời gian dài hơn miễn là chất lượng nước được theo dõi chặt.

Nước biển hoàn nguyên được chuẩn bị bằng cách cho nước muối siêu mặn (HSB) hoặc bằng cách cho trực tiếp muối khô vào nước ngọt thích hợp, với số lượng đủ để cung cấp độ mặn mong muốn^[22]. HSB cũng có thể được điều chế bằng cách sử dụng muối biển khô có bán trên thị trường hoặc muối loại thuốc thử^[47], hoặc sử dụng hóa chất cấp thuốc thử để tạo ra nước biển hoàn nguyên (Phụ lục A). Nước hoàn nguyên phải đồng nhất và được để yên từ 1 tuần đến 2 tuần rồi lọc^{[1], [2]} ($\leq 5 \mu\text{m}$) ngay trước khi sử dụng để loại bỏ các hạt lơ lửng và cần được sử dụng trong vòng 24 h sau khi lọc.

Nước biển hoàn nguyên được chuẩn bị bằng cách cho một lượng muối chất lượng thuốc thử vào nước đã khử ion hoặc nước cất có độ tinh khiết cao^[47]. Thuốc thử muối phù hợp có thể là hóa chất cấp thuốc thử hoặc muối biển thương mại. Cũng có thể sử dụng nước muối pha sẵn (ví dụ: từ 60 % đến 90 %) được pha chế bằng muối biển khô hoặc nước biển tự nhiên cô đặc bằng nhiệt.

4.2.2 Độ mặn

Việc chọn các điều kiện độ mặn thử nghiệm thích hợp phụ thuộc vào độ mặn của nước lỗ rỗng của trầm tích thử nghiệm, khoảng dung sai về độ mặn của các loài thử nghiệm và mục tiêu thử nghiệm. Để đánh giá trầm tích biển hoặc trầm tích cửa sông, thì độ mặn thử nghiệm và điều kiện thích nghi có thể nằm trong khoảng từ 1 g/kg đến 35 g/kg, tùy thuộc vào loài thử nghiệm được chọn (xem Phụ lục B). Độ mặn có thể được điều chỉnh bằng cách bổ sung muối biển khô hoặc nước muối hoặc nước cất (nếu quá mặn).

4.2.3 Hàm lượng oxy hòa tan

Hàm lượng oxy hòa tan của lớp nước biển bao phủ lớp trầm tích phải bằng 85 % giá trị độ bão hòa không khí hoặc cao hơn trong thời gian giữ hoặc thích nghi sinh vật thử nghiệm, từ khi bắt đầu thử nghiệm và trong suốt 10 ngày thử nghiệm. Duy trì mức oxy hòa tan này bằng cách sục nhẹ không khí vào nước biển, sử dụng không khí nén không dầu, đã lọc, nhưng tốc độ sục khí không được khuấy động trầm tích.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị phòng thử nghiệm thông thường và các thiết bị dưới đây để giữ hoặc nuôi và thử nghiệm sinh vật^{[3], [18], [31], [48]}. Trước khi bắt đầu thử nghiệm, đảm bảo rằng tất cả các bình thử nghiệm và dụng cụ liên quan đều sạch và không có chất gây ô nhiễm từ lần sử dụng trước đó^{[1], [28]}.

5.1 Kiểm soát môi trường, thiết bị kiểm soát nhiệt độ và cường độ ánh sáng.

5.2 Máy đo và/hoặc dụng cụ đo hàm lượng oxy hòa tan, độ pH, độ mặn, tổng cacbon hữu cơ, amoniac, nitrat, cường độ ánh sáng và nhiệt độ.

5.3 Dụng cụ chứa

Các dụng cụ chứa và phụ kiện, như lưới lọc, có thể tiếp xúc với sinh vật, trầm tích đối chứng hoặc thử nghiệm và nước biển trong quá trình phân loại, xử lý, giữ và thích nghi phải được làm bằng vật liệu không độc (ví dụ: thủy tinh, thép không gỉ, polyolefin, nylon, sứ, polyetylen, polypropylen, sợi thủy tinh) được làm sạch và tráng bằng nước cất, nước khử ion, nước khử clo trong phòng thử nghiệm, nước biển hoàn nguyên hoặc nước biển tự nhiên từ địa điểm thu gom hoặc nguồn không bị ô nhiễm.

Các vật liệu như đồng, kẽm, đồng thau, kim loại mạ kẽm, chì và cao su tự nhiên không được tiếp xúc với thiết bị và dụng cụ này, hoặc với các mẫu trầm tích đối chứng, đối chiếu hoặc thử nghiệm, nước biển hoặc bình thử nghiệm.

Các dụng cụ chứa thủy tinh 1 L (cốc hoặc bình miệng rộng) có đường kính trong khoảng 10 cm được khuyến nghị sử dụng làm bình thử nghiệm. Đậy bình bằng nắp thủy tinh hoặc nắp nhựa để giảm khả năng ô nhiễm và giảm bay hơi.

6 Xử lý và chuẩn bị mẫu

6.1 Yêu cầu chung

Thu thập trầm tích từ các địa điểm đối chiếu, đối chứng và thử nghiệm theo các thực hành^{[1], [3], [18], [19], [20]} đã được thiết lập hoặc, nếu cần, thêm hóa chất thử nghiệm hoặc chế phẩm thử nghiệm vào mẫu trầm tích đối chứng^{[1], [18], [20]}. Cần sử dụng quy trình thu gom và xử lý trầm tích tương tự cho cả trầm tích thử nghiệm và đối chứng trong cùng một chương trình thử nghiệm. Bảo quản trầm tích thu được trong dụng cụ chứa kín, trong tối ở nhiệt độ $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ cho đến khi thử nghiệm độc tính. Việc sấy khô, đông lạnh và bảo quản lạnh đều ảnh hưởng đến độc tính và tính khả dụng sinh học của hóa chất trong trầm tích. Bắt đầu thử nghiệm trầm tích càng sớm càng tốt để duy trì tính toàn vẹn về mặt hóa học, nhưng tốt nhất là trong vòng 5 ngày và không quá 30 ngày trừ khi có thể đảm bảo tính ổn định hóa học. Việc phân tích các chất ô nhiễm hóa học đã biết có thể được tiến hành trên các mẫu trầm tích từ hiện trường và kết quả có thể được so sánh để phân tích trầm tích lúc bắt đầu và kết thúc thử nghiệm để định lượng mọi sự thay đổi về nồng độ hoặc dạng hóa chất.

6.2 Trầm tích đối chứng hoặc trầm tích đối chiếu

Trầm tích đối chứng thu được từ vị trí thu thập giáp xác amphipoda có thể được sử dụng làm trầm tích đối chứng âm cho phép thử, làm nguyên liệu sạch để bổ sung hóa chất thử nghiệm hoặc để nuôi cấy sinh vật. Trầm tích đối chiếu sạch có thể được sử dụng như một biện pháp đối chứng thực nghiệm bổ sung.

6.3 Trầm tích thử nghiệm

Thu thập trầm tích thử nghiệm tại hiện trường bằng thiết bị như dụng cụ khoan lõi²⁾ hoặc gầu ngoạm³⁾. Trầm tích được lấy từ giữa dụng cụ lấy mẫu không tiếp xúc với thiết bị. Thông thường, lớp trầm tích từ 2 cm đến 4 cm trên cùng đại diện cho vùng được thu thập và được tổng hợp từ các mẫu đủ để đáp ứng nhu cầu của thử nghiệm. Trầm tích ở độ sâu hơn có thể được thu thập để kiểm tra tùy thuộc vào mục tiêu của nghiên cứu. Chuyển trầm tích bằng thìa đã được làm sạch trước vào bình trơn và trộn mẫu đến khi màu sắc và kết cấu đồng nhất. Bảo quản mẫu hỗn hợp trong dụng cụ chứa thủy tinh màu nâu sạch (nếu nghi ngờ có chất ô nhiễm hữu cơ) hoặc trong dụng cụ chứa sạch bằng polyetylen hoặc polycarbonat mật độ cao (nếu nghi ngờ có chất ô nhiễm kim loại). Đổ đầy dụng cụ chứa và vận chuyển đến phòng thử nghiệm ở nhiệt độ $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dụng cụ phải được làm sạch giữa các nơi lấy mẫu để tránh ô nhiễm chéo (xem Điều 5). Giữ lại mọi dung môi làm sạch chất thải và đưa trở lại phòng thử nghiệm để xử lý thải bỏ.

6.4 Chuẩn bị mẫu trầm tích

Dùng kẹp hoặc dụng cụ tương tự loại bỏ các hạt lớn ($> 1\text{ cm}$) và các sinh vật bản địa. Không cần sàng trầm tích, vì các chất ô nhiễm hòa tan trong nước và các hạt sét mịn không lắng có thể bị mất. Để nước cân bằng đến nhiệt độ thử nghiệm và thử độ mặn thích hợp cho loài thử nghiệm (xem Phụ lục B) và sục khí đến hàm lượng oxy hòa tan bão hòa 85 % hoặc cao hơn. Nếu trầm tích đối chứng/đối chiếu được sử dụng khi kết thúc phép thử xác định khả năng sống của các giáp xác amphipoda, làm kín lại và làm lạnh trầm tích.

Đặc tính hóa học và vật lý của mẫu trầm tích rất hữu ích trong việc diễn giải kết quả. Để lắng trầm tích đã sàng ít nhất 4 h để thu hồi các hạt mịn, trước khi gửi để phân tích kích thước hạt và thành phần hóa học. Phân tích mẫu phụ của trầm tích về: tổng lượng cacbon hữu cơ và phân phối cỡ hạt (phần trăm sỏi, cát thô và cát mịn, bùn và cấp hạt sét), và độ mặn của nước lỗ rỗng (trước khi sàng trong phòng thử nghiệm). Đặc tính khác có thể bao gồm tổng dư lượng dễ bay hơi, các sunfua dễ bay hơi axit (AVS)/kim loại được chiết đồng thời (SEM), phần trăm hàm lượng nước, nhu cầu oxy sinh hóa và/hoặc nhu cầu oxy trầm tích, tổng kim loại, tổng hàm lượng hữu cơ đã clo hóa, các hợp chất hữu cơ đã clo hóa, hydrocacbon thơm đa vòng, dầu và mỡ^{[3], [18]}. Nước lỗ rỗng cũng có thể được lấy mẫu và phân tích độ pH, tổng amoniac, hydro sunfua và các chất ô nhiễm hòa tan. Các mẫu nước lỗ rỗng có thể được lấy từ trầm tích đối chứng hoặc đối chiếu bằng các phương pháp tại chỗ (ví dụ: trực quan) hoặc các phương pháp ngoài hiện trường (ví dụ: ly tâm hoặc ép) ^{[1], [19] [35]}.

Trộn kỹ từng mẫu trầm tích vào ngày trước khi thử nghiệm và cho phần 175 mL trầm tích (xem 6.3) vào bình thử nghiệm. Phân phối trầm tích thử nghiệm thành lớp đều, cho phép giáp xác amphipoda đào bới (chui xuống) (độ sâu tối thiểu 2 cm). Chuẩn bị tối thiểu ba lần lặp lại cho mỗi phương pháp xử lý hoặc

²⁾ Hộp Phleger là ví dụ về sản phẩm phù hợp có sẵn ngoài thị trường. Thông tin này được đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng và không được chứng thực bởi tiêu chuẩn này.

³⁾ Ekman, Ponar, van Veen, Petersen, Shipek và Kajak-Brinkhurst là các ví dụ về các sản phẩm phù hợp có sẵn ngoài thị trường. Thông tin này được đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng và không được chứng thực bởi tiêu chuẩn này.

mẫu thử nghiệm, cộng với một hoặc nhiều phương pháp xử lý lặp lại để theo dõi các đặc tính hóa học của trầm tích và nước thử nghiệm trong quá trình thử nghiệm. Thực hiện các lần lặp lại để theo dõi giáp xác amphipoda, giống như trong các phép thử nghiệm lặp lại.

Làm phẳng bề mặt trầm tích trong mỗi lần xử lý và đảm bảo sự xáo trộn tối thiểu đối với trầm tích thử nghiệm hoặc trầm tích kiểm chứng trong quá trình bổ sung lớp nước phía trên. Kỹ thuật để giảm thiểu sự phá vỡ trầm tích là thêm nước biển bằng cách đổ lên đĩa (tấm polyetylen, ni lông hoặc polytetrafluoroetylen có độ dày từ 4 mm đến 6 mm) nằm trên bề mặt trầm tích phù hợp với đường kính trong của bình thử nghiệm^{[3], [18]}. Thêm nước biển vào từng bình thử để tạo nên tổng thể tích (nước cộng với trầm tích) là 900 mL. Lấy đĩa ra và rửa sạch bằng nước biển giữa các lần xử lý lặp lại. Sử dụng một đĩa sạch riêng biệt cho mỗi lần xử lý.

Nếu mục tiêu của nghiên cứu là bổ sung trầm tích bằng hóa chất hoặc chế phẩm, thì cần có sẵn các quy trình diễn giải các bước liên quan đến bổ sung trầm tích, đồng hóa, xác minh sự cân bằng hóa học và phân tích dữ liệu (xem Tài liệu tham khảo [1], [18], [20]). Một số hướng dẫn về trầm tích bổ sung để thử nghiệm được cung cấp trong Điều 9.

7 Quy trình thử nghiệm

7.1 Chuẩn bị các bình tiếp xúc

Mỗi bình thử nghiệm phải được mã hóa hoặc dán nhãn rõ ràng để nhận biết chất/nồng độ thử nghiệm, ngày và thời gian bắt đầu thử nghiệm. Các phương pháp xử lý cần được định vị để dễ dàng quan sát giáp xác amphipoda. Tốt nhất là, các xử lý thử nghiệm cần được đặt theo thứ tự ngẫu nhiên hoặc theo thiết kế khối ngẫu nhiên với một xử lý lặp lại trong mỗi khối.

Phủ từng mẫu xử lý thử nghiệm (bao gồm cả các mẫu đối chứng) bằng nước biển và để trầm tích lắng xuống trước khi bắt đầu thử nghiệm. Sục không khí nước biển qua đêm hoặc ít nhất 2 h trước khi đưa các giáp xác amphipoda thử nghiệm vào và trong suốt thời gian thử nghiệm, sử dụng pipet thủy tinh hoặc nhựa với đầu tip cách bề mặt của lớp trầm tích từ 2 cm đến 4 cm. Việc sục khí cho mỗi lần xử lý thử nghiệm phải liên tục với tốc độ nhẹ để bề mặt trầm tích không bị xáo trộn.

7.2 Đưa các sinh vật vào bình thử nghiệm

Bắt đầu thử nghiệm độc tính bằng cách đặt 20 cá thể giáp xác amphipoda vào mỗi bình thử nghiệm (tức là 20 cá thể giáp xác amphipoda cho mỗi lần lặp lại của mỗi lần xử lý).

Lấy các giáp xác amphipoda đang hoạt động ra khỏi trầm tích trong dụng cụ chứa (xem 4.1.5) sử dụng sàng có mắt lưới 0,5 mm hoặc lớn hơn (tùy thuộc vào kích thước của giáp xác amphipoda được sử dụng trong thử nghiệm, xem Phụ lục B). Chọn ngẫu nhiên các cá thể sử dụng pipet hoặc dụng cụ phù hợp khác và phân phối chúng đều giữa các đĩa chứa ≤ 150 mL nước thử nghiệm. Ví dụ: cho một cá thể giáp xác amphipoda vào mỗi đĩa, sau đó thêm hai con vào mỗi đĩa, v.v... cho đến khi mỗi đĩa chứa 20 cá thể. Đếm lại để xác nhận số lượng cá thể giáp xác amphipoda trong mỗi đĩa.

Chuyển cá thể giáp xác amphipoda vào các bình thử bằng cách rót nhẹ nước và cá thể giáp xác amphipoda từ đĩa. Sử dụng đĩa như mô tả trong 6.4 để tránh xáo trộn trầm tích. Rửa các cá thể giáp xác amphipoda còn lại trong đĩa vào bình thử sử dụng thêm nước thử. Tăng thể tích trong bình thử đến 900 mL (nước cộng với trầm tích), lấy đĩa ra, đậy nắp bình thử và tiếp tục sục khí. Vì sử dụng các bình lặp lại, nên cần bổ sung cá thể giáp xác amphipoda cùng một lúc cho mỗi bộ hoặc khối bình thử nghiệm đại diện cho mỗi phương pháp xử lý, theo thiết kế khối ngẫu nhiên.

Tùy thuộc vào loài, thay thế các giáp xác amphipoda không đào hang vào trầm tích trong 1 h, trừ khi chúng được quan sát thấy liên tục đào hang để chui vào trầm tích và nổi lên ngay để tránh phản ứng với chất nền thử nghiệm. Không nên thay thế các cá thể giáp xác amphipoda thể hiện tập tính tránh né này trong giờ đầu tiên của phép thử.

7.3 Điều kiện thử nghiệm

Thử nghiệm phải ở trạng thái tĩnh (không thay thế trầm tích hoặc dung dịch phủ phía trên trong quá trình thử nghiệm).

Thời gian thử nghiệm phải là 10 ngày.

Thử nghiệm phải được tiến hành ở nhiệt độ và độ mặn phù hợp với loài được chọn để thử nghiệm (xem Phụ lục B).

Các trầm tích đối chứng và thử nghiệm (175 mL) phải được phân phối thành một lớp đều có độ dày ít nhất 2 cm, với nước biển ở trên được thêm vào để tăng tổng thể tích đến 900 mL.

Các dung dịch phủ trên lớp trầm tích phải được sục khí với tốc độ nhẹ, liên tục.

Chiếu sáng phải liên tục ổn định từ trên xuống từ 500 lx đến 1 000 lx trên bề mặt trầm tích thử nghiệm.

Không được cho ăn bổ sung trong quá trình thử nghiệm.

Để thử nghiệm trầm tích được thu thập tại hiện trường, phải thử nghiệm với tối đa năm bình lặp lại cho mỗi lần xử lý, nhưng tối thiểu ba bình lặp lại trong phòng thử nghiệm cho mỗi lần xử lý hoặc mẫu thử nghiệm. Đối với các thử nghiệm trong đó trầm tích đối chứng được bổ sung bằng chất thử nghiệm, thì nên sử dụng ba bình lặp lại, mỗi bình chứa 20 sinh vật thử nghiệm.

7.4 Quan sát thử nghiệm và đo

Hàng ngày kiểm tra từng bình thử để khẳng định dòng không khí đến dung dịch bên trên trầm tích không bị gián đoạn và không thay đổi. Đo và ghi lại nhiệt độ, độ mặn, hàm lượng oxy hòa tan (DO) và độ pH của nước biển phía trên khi bắt đầu thử nghiệm trong một hoặc nhiều lần tiếp xúc lặp lại. Hàng ngày đo và ghi lại nhiệt độ. Lưu ý xem cá thể giáp xác amphipoda đang bơi trong dung dịch phía trên hay nổi trên mặt nước. Nhẹ nhàng đẩy cá thể giáp xác amphipoda mắc trong màng bề mặt vào trong nước bằng que thủy tinh hoặc pipet. Thường không lấy cá thể chết ra trong quá trình thử nghiệm^{[8], [39]}.

Đối với các mẫu trầm tích thu thập tại hiện trường, đo độ mặn và độ pH của nước lỗ rỗng trong một hoặc nhiều bình lặp lại được thiết lập để theo dõi các đặc tính hóa học của trầm tích, ít nhất là khi bắt đầu thử nghiệm. Có thể lấy các mẫu nước lỗ rỗng bằng cách ly tâm, lọc chân không hoặc ép^{[1], [19]}. Các phép đo hàm lượng amoniac, AVS/SEM và/hoặc hydro sunfua của trầm tích (bao gồm cả trầm tích đối chứng và trầm tích đối chiếu) trong các bình lặp lại của các phương pháp xử lý riêng lẻ, được thiết lập cho mục đích này, có thể hỗ trợ diễn giải kết quả. Điều này không bắt buộc đối với thử nghiệm trầm tích bổ sung.

Đối với phép thử nhằm xác định việc tiếp xúc với trầm tích có gây ra phản ứng nổi lên hay không, thì hàng ngày ghi lại số lượng sinh vật sống trên bề mặt trầm tích, bơi trong vùng nước phía trên hoặc nổi trên mặt nước đối với từng bình thử nghiệm và trước khi xáo trộn và sàng lọc ở cuối phép thử.

Sau 10 ngày, sàng lượng chứa trong mỗi bình thử qua sàng 0,5 mm để loại bỏ các sinh vật thử nghiệm và xác định xem chúng còn sống hay đã chết. Có thể sử dụng nước thử nghiệm bổ sung có độ mặn và nhiệt độ nằm trong phạm vi hai đơn vị của nước được sử dụng trong thử nghiệm cho quá trình sàng này. Xác định tổng số cá thể giáp xác amphipoda còn sống và đã chết. Cá thể được coi là chết nếu chúng không có dấu hiệu chuyển động khi bị chạm nhẹ (dùng kính hiển vi hoặc kính lúp cầm tay).

7.5 Biểu thị kết quả

Tính tỷ lệ phần trăm trung bình (\pm độ lệch chuẩn) của cá thể giáp xác amphipoda chết trong thời gian 10 ngày tiếp xúc cho mỗi lần xử lý.

Sau đó, các giá trị trung bình của các lần lặp lại đối với từng trầm tích thử nghiệm được so sánh thống kê với các giá trị tương ứng đối với cá thể giáp xác amphipoda được giữ trong trầm tích đối chiếu và/hoặc đối chứng trong các điều kiện giống hệt nhau.

7.6 Khả năng đào hang lại

Nếu một trong những mục tiêu thử nghiệm là xác định ảnh hưởng của việc tiếp xúc 10 ngày với trầm tích thử nghiệm về khả năng sống sót của cá thể giáp xác amphipoda trong trầm tích đối chứng^{[3], [18], [39], [45]}, ghi lại số lượng cá thể giáp xác amphipoda còn sống hoàn toàn hoặc một phần từ trầm tích trước khi sàng. Chuyển tất cả các cá thể giáp xác amphipoda còn sống sang các dụng cụ chứa có lớp trầm tích đối chứng dày 2 cm [đã điều chỉnh trước đến nhiệt độ phù hợp với loài (xem Phụ lục B) và sàng qua sàng 0,5 mm bằng nước thử nghiệm] và một lớp (> 2 cm) nước thử nghiệm. Ghi lại số lượng cá thể giáp xác amphipoda sống sót không thể đào hang lại vào trong lớp trầm tích đối chứng trong 1 h cho mỗi bình thử nghiệm. Đối với một số loài (ví dụ: *Monoporeia affinis*), lựa chọn phép thử nghiệm đào hang lại có thể khó hơn vì không phải tất cả các loài đều có thể đào hang lại ngay.

Nếu mục tiêu bổ sung của phép thử là xác định tốc độ đào hang lại, thì tính tỷ lệ phần trăm trung bình (\pm độ lệch chuẩn) của các cá thể giáp xác amphipoda sống sót từ mỗi trầm tích thử nghiệm pha rắn trong ≤ 10 ngày và tỷ lệ phần trăm trung bình (\pm độ lệch chuẩn) của phần trăm cá thể giáp xác amphipoda sống sót không đào hang lại trong trầm tích đối chứng sau khi kết thúc tiếp xúc.

7.7 Hiệu lực của phép thử

Xem phép thử là hợp lệ khi tỷ lệ sống sót trung bình giữa các sinh vật trong trầm tích đối chứng là 85 % hoặc cao hơn và khi tỷ lệ sống sót là 80 % hoặc cao hơn trong mọi lần lặp lại đối chứng đơn lẻ trong khoảng thời gian tiếp xúc 10 ngày.

8 Phân tích và diễn giải kết quả

8.1 Phân tích dữ liệu

Sử dụng phương pháp thử nghiệm sinh học này, việc so sánh dữ liệu tỷ lệ sống theo từng cặp đối với từng phương pháp xử lý thử nghiệm thường được thực hiện đối với dữ liệu tỷ lệ sống thu được cho trầm tích đối chứng hoặc đối chiếu cụ thể. Đầu tiên, thử nghiệm tính chuẩn của tất cả dữ liệu sử dụng phép thử Shapiro-Wilk và tính đồng nhất của phương sai bằng phép thử Bartlett hoặc các phép thử phù hợp khác.

Nếu sử dụng các phương pháp xử lý lặp lại để tính độ độc cấp tính của mẫu trầm tích với độ độc của từng trầm tích đối chiếu hoặc đối chứng, thì áp dụng phép thử *t*-student^[37]. Nếu bộ dữ liệu không thể đáp ứng các yêu cầu về tính quy tắc và tính đồng nhất của phương sai, thì cần áp dụng biến căn bậc hai. Nếu dữ liệu được chuyển đổi vẫn không đáp ứng các giả định về tính quy tắc, thì có thể áp dụng các thống kê phi tham số như phép kiểm thử Rank Sum^[46]. Nếu dữ liệu được chuyển đổi đáp ứng giả định về tính quy tắc, thì có thể sử dụng phép thử Bartlett hoặc phép thử F Hartley để kiểm tra tính đồng nhất của giả định phương sai.

Để so sánh các biến đổi độc tính theo không gian của trầm tích bằng cách sử dụng nhiều mẫu, phân tích phương sai (ANOVA), tiếp theo là phép thử Dunnett, phép thử William^{[50], [51]} hoặc quy trình thay thế khác để so sánh nhiều lần từng trầm tích thử nghiệm với trầm tích đối chiếu và/hoặc đối chứng, có thể được thực hiện sau các biến đổi arcsine cần thiết, để xác định xem các giá trị điểm cuối cho các phương pháp xử lý khác nhau có khác biệt đáng kể hay không^{[9], [18], [21], [37], [46]}. Để biết thêm hướng dẫn về xử lý thống kê dữ liệu thử nghiệm, tham khảo ISO/TS 20281^[55] hoặc Tài liệu tham khảo [23].

8.2 Các yếu tố không phải chất ô nhiễm

Có một số yếu tố không phải chất ô nhiễm có thể ảnh hưởng đến khả năng sống của giáp xác amphipoda trong thử nghiệm này. Các yếu tố quan trọng nhất bao gồm kích thước hạt trầm tích và độ mặn của nước lỗ rỗng, amoniac và hydro sunfua^{[9], [25], [26], [30], [43]}. Đối với hầu hết các loài giáp xác amphipoda dài cỡ hạt trầm tích^{[21], [46]} được liệt kê trong Phụ lục B. Nồng độ của amoniac và/hoặc hydro sunfua trong nước lỗ rỗng có thể tăng cao trong các mẫu vật liệu nạo vét hoặc trầm tích cửa sông hoặc trầm tích biển thu được tại hiện trường. Mức tăng cao có thể là do giàu chất hữu cơ từ các nguồn tự nhiên và/hoặc nhân tạo. Các giới hạn dung sai đã biết của các loài sinh vật thử nghiệm cần được xem xét cùng với mức đo được của các thành phần độc hại khi đánh giá ý nghĩa của chúng trong việc ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm^{[21], [43]}.

9 Chất độc đối chiếu

Thử nghiệm với chất độc đối chiếu rất hữu ích để đánh giá độ nhạy tương đối của quần thể sinh vật dự kiến được sử dụng để nghiên cứu độc tính của các chất thử nghiệm, cũng như độ chụm và độ tin cậy của dữ liệu do phòng thử nghiệm tạo ra^{[17], [20]}. Cadimi cấp loại thuốc thử (như cadimi clorua), đồng (dưới dạng đồng sunfat), amoniac (dưới dạng amoni clorua) và floanthen được khuyến nghị làm chất độc đối chiếu cho thử nghiệm này^{[3], [18], [20], [33], [41], [46]}. Nhiều nghiên cứu đã ghi lại khả năng cadimi gây chết cấp tính đến giáp xác amphipoda ở biển hoặc cửa sông, chỉ sử dụng các thử nghiệm nước biển^{[14], [28], [39], [42]}. Một tùy chọn khác là phép thử LC50 tính 3 ngày, sử dụng khoảng nồng độ amoniac (dưới dạng amoni clorua ở pH $8,0 \pm 0,5$) chỉ trong nước biển (không có trầm tích)^[33]. Khi tiến hành thử nghiệm LC50 trong 4 ngày chỉ với nước biển với cadimi hoặc thử nghiệm LC50 trong 3 ngày với amoniac, các điều kiện và quy trình phải giống như trong 6.3, trừ việc không cho trầm tích vào các bình thử nghiệm.

Yêu cầu cơ bản đối với ba lần lặp lại của mỗi lần xử lý (cộng với ít nhất một lần lặp lại để theo dõi chất lượng nước và trầm tích), đối với tất cả trầm tích thử nghiệm, có thể được thực hiện với các thử nghiệm với chất độc đối chiếu do hạn chế về không gian và/hoặc do số lượng hạn chế của cá thể giáp xác amphipoda thử nghiệm. Tối thiểu hai lần lặp lại và 10 (và tốt nhất là 20) cá thể giáp xác amphipoda phải được tiếp xúc với mỗi nồng độ của chất độc đối chiếu được thử nghiệm.

Ngoài ra, trầm tích đối chứng có thể được cho thêm đồng, cadimi hoặc floruat và được sử dụng để xác định LC50 10 ngày^[20]. Các thử nghiệm với chất độc đối chứng phải được bắt đầu trong 1 ngày kể từ khi bắt đầu thử nghiệm 10 ngày với chất thử nghiệm. Các thử nghiệm độc tính sử dụng trầm tích đối chứng được thêm đồng đã được thực hiện^{[7], [20]}.

Khi chọn trầm tích đối chứng để bổ sung với hóa chất, cần chứng minh trước khi lựa chọn cuối cùng rằng > 90 % sinh vật thử nghiệm sống được trong trầm tích này. Ở mức tối thiểu, trầm tích đối chứng sử dụng phải được đặc trưng về tổng hàm lượng cacbon hữu cơ, phân bố cỡ hạt, pH, phần trăm nước và nồng độ AVS (nếu chất độc đối chiếu là hợp chất vô cơ). Độ ẩm của trầm tích đối chứng phải được xác định trước khi thêm chuẩn để chuẩn hóa việc thêm chuẩn theo khối lượng khô.

Các kỹ thuật thêm chuẩn ướt hiện đang được chấp nhận nhiều để chuẩn bị trầm tích thêm chuẩn. Phương pháp huyền phù trầm tích [tỷ lệ khối lượng trầm tích trên thể tích nước là 1:4 (theo khối lượng khô)] được khuyến nghị. Hỗn hợp nên được khuấy ở tốc độ vừa phải trong thời gian tối thiểu là 4 h. Sau quy trình trộn, phải đảm bảo đủ thời gian để cân bằng chất độc đối chiếu. Nếu không biết thời gian tối thiểu để nước lỗ rỗng/trầm tích cân bằng, thì nên cho phép các trầm tích thêm vào cân bằng trong bốn tuần^[20]. Mỗi nồng độ thử nghiệm phải được chuẩn bị riêng lẻ. Không được pha loãng tiếp trầm tích đã thêm chuẩn^[6]. Nồng độ định danh của chất đối chiếu được thêm vào phải được xác nhận bằng các phép đo thực tế của chất đó trong trầm tích thử nghiệm thông qua phân tích hóa học. Bước này xác nhận tính chính xác của kỹ thuật thêm chuẩn mẫu được sử dụng. Hướng dẫn về việc lựa chọn và sử dụng chất độc đối chiếu để ước tính độ chính xác của phép thử độc tính được cung cấp trong hai tài liệu kèm theo^{[17], [20]}. Trong khi thường xuyên thực hiện các xét nghiệm với các chất độc đối chiếu, nhân viên phòng thử nghiệm cần chuẩn bị và cập nhật biểu đồ kiểm soát riêng cho từng chất độc đối chiếu được sử dụng.

10 Độ chụm

Dữ liệu chụm nhằm cung cấp thông tin được nêu trong Phụ lục C.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này [nghĩa là TCVN 13914:2023 (ISO 16712:2003)];
- b) Tên và địa điểm của cơ sở thử nghiệm và ngày nghiên cứu;
- c) Nhận dạng cá nhân chịu trách nhiệm về kết quả thử nghiệm;
- d) Tên hoặc nhận dạng mẫu và nguồn mẫu;
- e) Các đặc tính hóa lý đo được [ví dụ: độ ẩm, hàm lượng cacbon hữu cơ tổng số và hòa tan, AVS/SEM, chất dễ bay hơi, phân bố cỡ hạt, nhu cầu oxy sinh hóa (BOD), nhu cầu oxy trầm tích (SOD), pH, Eh, hàm lượng kim loại hòa tan và tổng số, chất hữu cơ];
- f) Quy trình thu gom, xử lý và lưu trữ trầm tích hoặc quy trình bổ sung trầm tích, nếu được tiến hành;
- g) Xác định nguồn gốc hoặc nuôi cấy và ước tính phân bố, nếu được thu thập tại hiện trường;
- h) Xác minh loài và phân loại;
- i) Quy trình thu thập, thích nghi, lưu giữ hoặc nuôi sinh vật;
- j) Điều kiện vật lý (thời gian chiếu sáng, cường độ ánh sáng, nhiệt độ, độ mặn) và phương pháp tiếp xúc;
- k) Phương pháp phân tích hóa học và thiết kế mẫu phân tích;
- l) Mô tả môi trường nuôi;
- m) Thiết kế tiếp xúc (vi sinh vật trên mỗi lần xử lý, số lần lặp lại, số lượng mẫu rời rạc);
- n) Mô tả quá trình chuẩn bị mẫu trầm tích;
- o) Kết quả phân tích hóa học và vật lý của trầm tích thử nghiệm;
- p) Mô tả các điều kiện thử nghiệm (hàm lượng oxy hòa tan, nhiệt độ, pH, độ mặn, TOC/DOC, amoniac, nitrit, sunfua);
- q) Kết quả về tỷ lệ chết của sinh vật (số lượng và ngày tháng);
- r) Phân tích thống kê dữ liệu sinh vật chết; tính toán LC50, nếu thích hợp;
- s) Nhận xét về các tác động sinh học khác quan sát được hoặc đo được (ví dụ sự nổi lên, sự chôn vùi);
- t) Mô tả mọi sai lệch so với phương pháp và diễn giải.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Nước biển hoàn nguyên

Phương pháp tạo nước biển hoàn nguyên theo ASTM E729:1996.

Các hóa chất cấp thuốc thử được thêm vào 890 mL nước với lượng (khối lượng) và được liệt kê theo thứ tự trong Bảng A.1 sau đây. Mỗi hóa chất đã được hóa tan trước khi được thêm vào.

Bảng A.1 – Các hóa chất cấp thuốc thử

Hóa chất	Khối lượng
NaF	3 mg
SrCl ₂ ·6H ₂ O	20 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
KBr	100 mg
KCl	700 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,47 g
Na ₂ SO ₄	4,00 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,78 mg
NaCl	23,50 mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	20 mg
Na ₄ EDTA ^a	1 mg
NaHCO ₃	200 mg
^a Nên bỏ qua Tetranatri etylen diamin tetra axetat khi thử nghiệm độc tính trên kim loại. Khi các thử nghiệm được tiến hành với cá hoặc ấu trùng nhuyễn thể hai mảnh vỏ, cá thể phù du hoặc cá thể giáp xác, nên bỏ qua EDTA và loại bỏ kim loại vết trong nước muối đã hoàn nguyên ^[15] .	

Pha loãng dung dịch đã thêm vào ở trên tới 1 L và kiểm tra độ mặn là 34 g/kg ± 0,5 g/kg và pH là 8,0 ± 0,2. Nếu các giá trị không nằm trong khoảng trên, lặp lại việc chuẩn bị, chú ý rằng đây là các khối lượng chính xác của các thành phần đã cân và cân đã được hiệu chuẩn.

Phụ lục B

(Quy định)

Chiều dài tối đa của các loài giáp xác amphipoda, độ mặn tối ưu và khoảng nhiệt độ

Bảng B.1 liệt kê các loài giáp xác amphipoda được sử dụng trong tiêu chuẩn này

Bảng B.1 – Các loài giáp xác amphipoda

	Chiều dài tối đa mm	Khoảng độ mặn tối ưu g/kg	Nhiệt độ thử °C
Các loài đại tây dương			
<i>Amphiporeia virginiana</i>	5	15 đến 35	10 ± 2
<i>Corophium volutator</i>	12	10 đến 30	15 ± 2
<i>Gammarus locusta</i>	5	20 đến 35	15 ± 2
<i>Ampelisca abdita</i>	8	10 đến 30	20 ± 2
<i>Leptocheirus plumulosus</i>	5	1,5 đến 32	25 ± 2
<i>Corophium arenarium</i>	10	26 đến 34	15 ± 2
<i>Monoporeia affinis</i>	10	2 đến 20	4 ± 2
Các loài thái bình dương			
<i>Eohaustorius estuarius</i>	5	4 đến 34	15 ± 2
<i>Eohaustorius washingtonianus</i>	5	15 đến 35	15 ± 2
<i>Foxiphalus xiximeus</i>	6	25 đến 35	15 ± 2
<i>Rhepoxynius abronius</i>	5	25 đến 35	15 ± 2
<i>Grandiderella japonica</i>	6	30 đến 35	17 ± 6
<i>Ampelisca abdita</i>	8	10 đến 35	20 ± 2
Các loài địa trung hải			
<i>Corophium orientale</i>	4	0 đến 36	15 ± 2

Thông tin độ mặn và nhiệt độ các loài thu được từ Tài liệu tham khảo [3], [13], [18], [21], [24], [27], [32], [33], [38], [46].

Chiều dài tối đa của các loài thử nghiệm quan tâm bao gồm cả râu (xem 4.1.2).

Phụ lục C

(Tham khảo)

Dữ liệu độ chum

Như chương trình đảm bảo chất lượng BEQUALM, có 14 đến 16 phòng thử nghiệm từ Ủy ban Châu Âu đã tham gia thử nghiệm liên phòng đối với hai chất, chất diệt khuẩn BiotanTM) và thuốc trừ sâu IvermectinTM), để xác nhận khả năng phương pháp thử năng sống sót trong 10 ngày dụng loài giáp xác amphipoda *Corophium volutator*. Hệ số biến thiên trong phòng thử nghiệm và giữa phòng thử nghiệm đối với mỗi vòng thử nghiệm được nêu trong Bảng C.1^[29].

Bảng C.1 – Dữ liệu độ chum đối với thử nghiệm trầm tích thêm chuẩn sử dụng loài *Corophium volutator*

Chất thử nghiệm	Số phòng thử nghiệm tham gia	Hệ số biến thiên trong phòng thử nghiệm %	Hệ số biến thiên giữa phòng thử nghiệm %
Chất diệt khuẩn Bioban TM	12	7,9	24,2
Ivermectin TM – Vòng 1	14	6,7	28,0
Ivermectin TM – Vòng 2	14	8,8	20,2

Để xác nhận phương pháp thử khả năng sống sót trong 10 ngày của sinh vật biển và cửa sông, Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ đã tài trợ thử nghiệm liên phòng bao gồm 10 phòng thử nghiệm từ Hoa Kỳ đến Canada vào năm 1995. Chất thử đã sử dụng trong tất cả các vòng thử nghiệm là trầm tích biển ô nhiễm từ Cảng Đá Đen, Connecticut. Ba loài giáp xác amphipoda biển và cửa biển, *Ampelisca abdita*, *Eohaustorius estuarius* và *Leptocheirus*, đã được đánh giá về giá trị trung bình của khả năng sống sót và biến thiên giữa các phòng thử nghiệm. Các kết quả từ việc thử nghiệm 7 % trầm tích của cảng Đá Đen được tổng hợp trong Bảng C.2^[34].

Bảng C.2 – Dữ liệu độ chum đối với trầm tích ô nhiễm sử dụng ba loài giáp xác amphipoda

Loài được đánh giá	Số phòng thử nghiệm tham gia	Trung bình phần trăm sống sót %	Độ lệch chuẩn	Hệ số biến thiên giữa phòng thử nghiệm %
<i>Ampelisca abdita</i>	6	70,7	27,0	38,9
<i>Eohaustorius estuarius</i>	8	68,1	14,7	21,6
<i>Leptocheirus plumulosus</i>	7	46,3	27,7	59,8

Năm 1991, Cơ quan môi trường Canada đã tài trợ một vòng thử nghiệm liên phòng thử nghiệm bao gồm ba phòng thử nghiệm thử nghiệm bốn trầm tích biển ô nhiễm với sáu loài, *Eohaustorius estuarius*, *Amphiporeia virginiana*, *Corophium volutator*, *Eohaustorius washingtonianus*, *Foxophilus xiximeus* và *Rhepoxynius abronius*. Trọng tâm của chương trình xác nhận phương pháp này là để khẳng định tiêu chí xác nhận phép thử và các ảnh hưởng không ô nhiễm như kích thước hạt trầm tích đối với từng loài^[28].

4) BiobanTM và IvermectinTM là các ví dụ về các sản phẩm phù hợp có sẵn ngoài thị trường. Thông tin này được đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không được chứng thực bởi tiêu chuẩn này.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ASTM E1391:1994, *Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing*
- [2] ASTM E729:1996, *Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians*
- [3] ASTM E1367:1999, *Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods*
- [4] BARNARD, J.L. and BARNARD, C.M., (1982). "The genus *Rhepoxynius* (Crustacea: Amphipoda: *Rhoxocephalidae*) in American seas", *Smithsonian Contributions to Zoology*, **357**:1-49
- [5] BOUSFIELD, E.L., (1973). "Shallow-water gammaridean amphipoda of New England", Cornell University Press, Ithaca, NY, 312 p
- [6] BOWMER, C.T., (1994). "Paris Commission: Sediment reworker ring-test – 1993", TNO - Technical Report, 42 pp
- [7] CAIRNS, M.A., NEBEKER, A.V., GAKSTATTER, J.H. and GRIFFIS, W.L., (1984). "Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates", *Environ. Toxicol. Chem.*, **3**:435-445
- [8] CHAPMAN, P.M. and BECKER, S., (1986). "Recommended protocols for conducting laboratory bioassays on puget sound sediments", Puget Sound Estuary Program, U.S. Environmental Protection Agency, Seattle, WA
- [9] CHAPMAN, P.M., (1998). "Death by mud: Amphipod sediment toxicity tests", in *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*, WELLS, P.G., LEE, K. and BLAISE, C. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 457-464
- [10] CHAPMAN, P.M. and WANG, F., (2001). "Assessing sediment contamination in estuaries". *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 3-22
- [11] COSTA, F.O., (1997). "*Gammurus locusta* (L) em testes ecotoxicológicos: ecologia, cultura e sensibilidade a variáveis não-contaminantes", Ms. Thesis, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
- [12] COSTA, F.O., CORREIA, A.D. and COSTA, M.H. (1998). "Acute marine sediment toxicity: A potential new test with the amphipod, *Gammurus locusta*", *Ecotox. Environ. Safety*, **40**: 81-87
- [13] COSTA, F.O. and COSTA, M.H., (2000). "Review of the ecology of *Gammurus locusta* (L)", *Pol. Hydrobiol.*, **47**: 541-559
- [14] DE WITT, T.H., SWARTZ, R.C. and LAMBERSON, J.O. (1989). "Measuring the acute toxicity of estuarine sediments", *Environ. Toxicol. Chem.*, **8**:1035-1048
- [15] DONALD, C., PASSEY, B.I. and SWABY, R.J. (1952). "A comparison of methods for removing trace metals from microbiological media", *J. Gen. Microbiol.*, **10**: 177-190

- [16] EISENHART, C., HASTAY, M.W. and WALLACE, W.A. (1947). "*Techniques of Statistical Analysis*", Chapter 15, McGraw-Hill Book Co., New York, NY
- [17] Environment Canada, (1990). "Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants", Report EPS 1/RM/12, Conservation and Protection, Ottawa, ON
- [18] Environment Canada, (1992). "Biological test method: acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods". Report EPS 1/RM/26 (including October 1998 amendments), Conservation and Protection, Ottawa, ON
- [19] Environment Canada, (1994). "Guidance document on collection and preparation of sediments for physicochemical characterization and biological tests", Report EPS 1/RM/29, Conservation and Protection, Ottawa, ON
- [20] Environment Canada, (1995). "Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediment spiked with a reference toxicant", Report EPS 1/RM/30, Conservation and Protection, Ottawa, ON
- [21] Environment Canada, (1998). "Biological test method: reference method for determining acute lethality of sediment to marine or estuarine amphipods", EPS 1/RM/35, Environmental Technology Centre, Ottawa, ON
- [22] Environment Canada, (2001). "Revised procedure for adjusting salinity of effluent samples for marine sublethal toxicity testing conducted under Environmental Effects Monitoring (EEM) programs", December 2001, 10 p., Method Development and Applications Section, Environmental Technology Centre, Ottawa, ON
- [23] Environment Canada, (2004). "Guidance document on statistical methods to determine endpoints of toxicity tests. EPS 1/RM/46, Environmental Technology Centre, Ottawa, ON
- [24] ERIKSSON, A.K., SUNDELIN, B., BROMAN, D. and BALK, E. (1996). "Reproduction effects on *Monoporeia affinis* of HPLC-fractionated extracts of sediments from a pulp mill recipient", In: Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents, SERVOS, M.R., MUNKITTRICK, K.R., CAREY, J.H. and VAN DER KRAAK, G.J. (eds), St. Lucie press, Delray Beach, FL, pp 68-78
- [25] GIBSON, A.B., DILLON, T.M. and ENGLER, R.M. (1995). "Naturally occurring levels of ammonia and sulfide in pore water: An assessment of the literature, Environmental Effects of Dredging Technical Notes, EEDP-01-34, US Army Engineer Waterways Experimental Station, Vicksburg, MS
- [26] KOHN, N.P., WORD, J.Q., NIYOGI, D.K., ROSS, L.T., DILLON, T.M. and MOORE, D.W. (1994). "Acute toxicity of ammonia to four species of marine amphipod, Marine Environmental Res., **38** (1), 1-15
- [27] NEUPARTH, T., COSTA, F.O. and COSTA, M.H. (2002). Effects of temperature and salinity on the life history of *Gammarus locusta* (Amphipoda). Implications for ecotoxicological testing. Ecotoxicol. **11** (1): 61-73

- [28] PAINE, M.D. and MCPHERSON, C.A. (1991). "Phase IV studies of 10-day tests for sediment toxicity using marine or estuarine infaunal amphipods", Final Report, Prepared for Environment Canada (Marine Environment Division, EP, C&P) by EVS Consultants Ltd. North Vancouver, BC
- [29] PETERS, C. and AHLF, W. (2002). Validieren, harmonisieren und implementieren eines minimalen biologischen testsets zur bewertung mariner wasser- und sedimentproben, Technische Universität Hamburg-Harburg, Dezember 2002
- [30] POSTMA, J.F., DE VALK, S. DUBBOLDAM, M., MAAS, J.L., TONKES, M., SCHIPPER, C.A. and KATER, B.J. (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **53**: 236-237
- [31] RODDIE, B.D. and THAIN, J.E. (2001). "Biological effects of contaminants: *Corophium spp.* sediment bioassay and toxicity test. International Commission for Exploration of the Seas (ICES) – TIMES No. 28, 20 pp
- [32] RUFFO, S., (1982). "The amphipods of the Mediterranean", *Memoires de l'Institut oceanographique Monaco*, **13**: 354 p
- [33] SCHIPPER, C.A., BURGESS, R.M., VAN DEN DIKENBERG, B., KATER, B.J. and STRONKHORST, J. (1999). "Standard operating procedure, species 01 – Marine amphipod *Corophium volutator* – mortality sediment toxicity test". National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), 17 pp
- [34] SCHLEKAT, C.E., K.J. SWARTZ, R.J. ALBRECHT, B., ANTRIM, L., DOE, K., DOUGLAS, S., J.A., HANSEN, D.J., MOORE, D.W., MUELLER, C. and TANG, A. (1995). Interlaboratory comparison of a 10-day sediment toxicity test method using *Ampelisca abdita*, *Eohaustorius estuarius* and *Leptocheirus plumulosus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14** (12); 2163-2174
- [35] SETAC (2002). "Pore water toxicity: Biological, chemical and ecological considerations with a review of methods and applications, and recommendations for future research". R. Scott Carr and Marion Nipper (Ed.), SETAC Press, 310 pp
- [36] SOKAL, R.R. and ROHLF, F.J. (1969). "*Biometry*", W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA
- [37] STEEL, R.G.D. and TORRIE, J.H. (1960). "*Principles and Procedures of Statistics*", McGraw-Hill Book Co., New York, NY
- [38] SUNDELIN, B. and ELMGREN, R. (1991). "Meiofauna of an experimental soft bottom ecosystem – effects of macrofauna and cadmium exposure", *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **70**: 245-255
- [39] SWARTZ, R.C., DEBEN, W.A., JONES, J.K.P., LAMBERSON, J.O. and COLE, F.A., (1985a). "Phoxocephalid amphipod bioassay for marine sediment toxicity, P. 284-307 in: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium*, CARDWELL, R.D., PURDY, R. and BAHNER, R.C. (eds). ASTM STP 854, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

- [40] SWARTZ, R.C., G.R., SCHULTS, D.W., and LAMBERSON, J.O. (1985b). "Sediment toxicity to a marine infaunal amphipod: Cadmium and its interaction with sewage sludge", *Mar. Environ. Res*, **18**: 133-153
- [41] SWARTZ, R.C., SCHULTS, D.W., DEWITT, T.H., DITSWORTH, G.R. and LAMBERSON, J.O. (1990). "Toxicity of fluoranthene in sediment to marine amphipods: a Test of the Equilibrium Partitioning Approach to Sediment Quality Criteria", *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**: 1071-1080
- [42] TAY, K.-L., DOE, K.G., WADE, S.J., VAUGHAN, D.A., BERRIGAN, R.E. and MOORE, M.J. (1991). "Biological effects of contaminants in Halifax Harbour sediment", P. 383-426 in: *Proceedings 7th Annual Aquatic Toxicity Workshop*, November 5-7, 1990, Vancouver, B.C., CHAPMAN, P., BISHAY, F., POWER, E., HALL, K., HUDING, L., MCLEAY, D., NASSICHUK, M. and Knapp, W. (eds). *Canada Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* No. 1774, 1
- [43] TAY, K.-L., DOE, K.G., MACDONALD, A.J. and LEE, K. (1998). "The influence of particle size, ammonia, and sulfide on toxicity of dredged materials for ocean disposal", In *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*, WELLS, P.G., LEE, K., and BLAISE, C. (eds), CRC Press, Boca Raton, FL, pp 559-574
- [44] U.S. EPA, (1985). "Sediment sampling quality assurance user's guide". EPA 600/4/85/048. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Las Vegas, NV
- [45] U.S. EPA, (1990). "Amphipod sediment bioassay", P. 21-32 in: *Recommended Protocols for Conducting Laboratory Bioassays on Puget Sound Sediments*. Puget Sound Estuary Program, U.S. Environmental Protection Agency, Seattle, WA
- [46] U.S. EPA, (1994a). "Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods", U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/R-94/025, June 1994, Washington, DC
- [47] U.S. EPA, (1995). "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms, U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/R-95/136, August 1995, Washington, DC
- [48] U.S. EPA/U.S. ACOE, (1998). "Evaluation of dredged material proposed for discharge in waters of the U.S. (Testing Manual)", EPA 823-B-98-004, Washington, DC
- [49] U.S. EPA/U.S. ACOE, (2001). "Methods for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod, *Leptocheirus plumulosus*", Report EPA 600/R-01/020, March 2001, Washington, DC
- [50] WILLIAMS, D.A., (1971). "A test for differences between treatment means when several dose levels are computed with a zero dose control", *Biometrics*, **27**, 103-118
- [51] WILLIAMS, D.A. (1972). "The comparison of several dose levels with a zero dose control", *Biometrics*, **28**: 519-532

- [52] ISO 5667-16, *Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on biotesting of samples*
 - [53] TCVN 7325 (ISO 5814), *Chất lượng nước – Xác định oxy hòa tan – Phương pháp đầu đo điện hóa*
 - [54] TCVN 6492 (ISO 10523), *Chất lượng nước – Xác định pH*
 - [55] ISO/TS 20281, *Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*
-